

Project 101.6040

Niveaucontrole op het kwaliteitsonderzoek van boerderijmelk ten behoeve van het Centraal Orgaan voor Melkhygiëne.

Projectleider: ing. A.E.M. Vermunt.

Rapport 91.39

Augustus 1991

Kwaliteitsbewaking van de bepaling van
het celgetal met behulp van
Fossomatic-apparatuur.

ir. M.A.A.M. Naber

ing. A.E.M. Vermunt

Afdeling Microbiologie

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1991, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

afdeling microbiologie (6x)

programmabeheer en informatieverzorging (2x)

circulatie

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Wetenschap en Technologie

Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding

Directie Veehouderij en Zuivel (ir. J.J. Bakker)

Centraal Orgaan voor Melkhygiëne (L. Krijgsman)

Commissie van advies van het Centraal Orgaan voor Melkhygiëne (13x)

Nederlands Instituut voor Zuivel Onderzoek (NIZO)

Melkcontrolestation Noord

Melkcontrolestation Oost

Melkcontrolestation West

Coöperatieve vereniging voor Melkonderzoek Zuid Nederland

Regionaal Orgaan voor Melkhygiëne Noord

Regionaal Orgaan voor Melkhygiëne Oost

Regionaal Orgaan voor Melkhygiëne West

Regionaal Orgaan voor Melkhygiëne Zuid

ABSTRACT

Kwaliteitsbewaking van de bepaling van het celgetal met behulp van Fossomatic-apparatuur.

Quality control of the determination of somatic cell-count with Fossomatic-apparatus (in Dutch)

Report 91.39 August 1991

ir. M.A.A.M. Naber

ing. A.E.M. Vermunt

DLO-State institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)

PO Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands.

7 figures, 7 references

In this report the results are presented of a comparison between the following methods for determining somatic cell-count: Coulter Counter (particle counter), Fossomatic (fluoro-optic counter) and direct microscopic cell-count.

The results show that there are important differences between these 3 methods of analysis. The main conclusion is that the direct microscopic cell-count, in contrary to the determination with Coulter Counter, is a good reference method for the determination of cell-count with Fossomatic.

Keywords: microscope, cell-count, fluorescence

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIALEN & METHODE	8
2.1 Monsters melk	8
2.2 Microscopische celtelling	8
2.2.1 Werkwijze	8
2.2.2 Berekening microscopisch celgetal	8
2.3 Verwerking van de analyseresultaten	9
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	10
4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	11
5 LITERATUUR	12
BIJLAGEN	
1 WERKWIJZE MICROSCOPISCHE CELTELLING	
2 T/M 8, GRAFIEKEN EN UITKOMSTEN VAN DE REGRESSIEVERGELIJKINGEN	

()

()

SAMENVATTING

In dit verslag staan de resultaten vermeld van een vergelijking tussen de volgende methoden voor de bepaling van het celgetal: Coulter Counter (deeltjesteller), Fossomatic (fluoro-opto electronische telling) en de microscopische celgetalbepaling. Uit dit onderzoek blijkt dat er behoorlijke verschillen zijn tussen de resultaten van deze 3 analysemethoden. Belangrijke conclusie is dat de microscopische celgetalbepaling in tegenstelling tot de bepaling met de Coulter Counter, een goede referentiemethode is voor de bepaling van het celgetal met de Fossomatic.

()

()

1 INLEIDING

Ten behoeve van het kwaliteitsonderzoek van boerderijmelk vindt in Nederland onderzoek plaats van het celgetal. Dit onderzoek wordt uitgevoerd door 4 regionale melkcontrolestations. In het recente verleden werd dit celgetal elektronisch bepaald met de Coulter Counter (deeltjesteller). Het principe van deze meting is dat als een deeltje de meetopening in een meetbuis passeert, een weerstandsverandering optreedt die een maat is voor het aantal cellen, wat groter is dan een ingestelde drempelwaarde. Deze analysemethode werd op alle 4 de melkcontrolestations toegepast. RIKILT-DLO voerde de kwaliteitsborging van de analyse uit door ook gebruik te maken van een Coulter Counter. In de landelijke voorschriften was opgenomen dat alleen dán een andere methode van celgetalbepaling dan Coulter Counter mocht worden toegepast, als was aangetoond dat deze andere methode aan de Coulter Counter gelijkwaardige uitslagen opleverde.

Tegenwoordig gebruiken de vier melkcontrolestations andere apparatuur namelijk Fossomatics (type 360) om het celgetal te bepalen. Deze apparatuur meet volgens een ander principe; het is namelijk een fluoro-opto-elektronische telling waarbij het aantal lichtpulsen een maat is voor het celgetal. Er wordt licht uitgezonden door het complex gevormd tussen ethidiumbromide en het in de celkernen aanwezige DNA. Aangezien het principe van de analyse met de Coulter Counter dus afwijkend is van die van de Fossomatic, is in dit onderzoek nagegaan in hoeverre de Coulter Counter nog een juiste referentiemethode is, en of de microscopische celtelling niet meer geschikt hiervoor is.

De microscopische celtelling is een handmatige telling met de microscoop waarbij namelijk hetzelfde principe als bij de Fossomatic wordt toegepast (de Fossomatic is immers een geautomatiseerde microscopische telling). In internationale voorschriften (IDF, EG) (5.1, 5.2) wordt de microscopische telling ook als referentiemethode gebruikt (5.3). De microscopische celtelling komt er in het kort op neer dat met behulp van een kleurstof (ethidiumbromide) het DNA van somatische cellen gekleurd wordt. Op een afgebakend gebied op een glaspreparaat wordt 0,01 ml verdunde melk gebracht en gedroogd. Met behulp van een fluorescentie-microscoop kunnen vervolgens de oplichtende cellen geteld worden en kan het celgetal bepaald worden.

Dit onderzoek is tevens uitgevoerd om na te gaan hoe de Fossomatic-apparatuur het beste gebruikt kan worden. Er is bij dit apparaat namelijk een mogelijkheid om een slope en bias in te stellen. Deze waarden worden gebruikt om het gemeten celgetal opnieuw te berekenen.

Op dit moment gebruikt elk melkcontrolestation een eigen instelling van het apparaat: 2 melkcontrolestations gebruiken het apparaat met slope = helling = 1,000 en bias = intercept = 0, terwijl de 2 andere melkcontrolestations een zodanige slope en bias gebruiken dat de resultaten van Coulter Counter gelijkwaardig zijn aan de resultaten van de Fossomatic. Doel van dit onderzoek is dus ook om tot een uniforme methode te komen voor de bepaling van het celgetal met de Fossomatic.

2 MATERIALEN & METHODEN

2.1 Monsters melk

In het kader van de niveaucontrole worden door het RIKILT-DLO periodiek monsters melk vervaardigd die naar de melkcontrolestations gestuurd worden als rondzendmonsters. De melk is afkomstig van het MONED (Zutphen) en bestaat uit tankmelk van ten hoogste 3 dagen oud. De melkcontrolestations hebben de celgetalanalyse uitgevoerd met de Fossomatic met slope 1,000 en bias 0 en eventueel met variabele slope en bias. Op RIKILT-DLO is naast een bepaling met de Coulter Counter tevens een bepaling met de microscoop gedaan. De in dit rapport verwerkte gegevens zijn afkomstig uit de periode maart 1990 t/m mei 1991 (13 rondzendingen).

2.2 Microscopische celtelling

2.2.1 Werkwijze

Zie bijlage 1

2.2.2 Berekening van het microscopisch celgetal

Het oorspronkelijk aantal cellen is als volgt berekend:

aantal getelde cellen

----- * $66 \frac{2}{3}$ * 200 = aantal (*1000) cellen per ml

aantal banen

-factor $66 \frac{2}{3}$: de lengte van het gemarkeerde gebied = 20 mm,
gedeeld door de breedte van het gezichtsveld = 0,3 mm
 $20/0,3 = 66 \frac{2}{3}$ = het totaal aantal banen.

-factor 200 : er is 0,005 ml melk op het objectglas gebracht.

De duplo's van de celtellingen zijn gemiddeld.

De afwijking tussen de duplo's mag maximaal 5% zijn.

2.3 Verwerking van de analyseresultaten

Bij de verwerking van de resultaten worden alle celgetalwaarden gelogaritmeerd. Dit is op empirische gronden verantwoord omdat de spreiding in de waarden namelijk toeneemt met de hoogte van het celgetal. Bovendien is de procentuele standaardafwijking dan ook over het hele gebied gelijk. De berekende curve die van het type $\ln y = a + b \ln x + e$ is, zal ook beter het verloop van het verband tussen x en y weergeven. In de berekende curve is \ln = natuurlijke logaritme, a = intercept (bias), b = helling (slope) en e = residu (randstoringen).

Regressieberekeningen worden uitgevoerd waarbij y = microscopisch celgetal en x = fossomatic celgetal (x en y zijn dus omgedraaid). Uit een fossomatic uitslag wordt namelijk het juiste celgetal afgeleid en er wordt vanuit gegaan dat dit het microscopisch bepaalde celgetal is (5.5).

Aan de hand van de natuurlijke logaritmen van de duizendtallen ($Y = \ln y$, $X = \ln x$) worden A en B in de vergelijking $Y = A + BX$, de standaard- schattingsfout $s_{Y.X}$, de standaardafwijking s_B van B en de standaardafwijking s_A van A berekend volgens onderstaande formules:

$$B = \frac{n \cdot \Sigma XY - \Sigma X \cdot \Sigma Y}{n \cdot \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

$$A = \frac{\Sigma Y - B \cdot \Sigma X}{n}$$

$$s_{Y.X} = \left[\frac{1}{n-2} \cdot \left(\Sigma Y^2 - \frac{(\Sigma Y)^2}{n} - \frac{\left(\Sigma XY - \frac{\Sigma X \Sigma Y}{n} \right)^2}{\Sigma X^2 - \frac{(\Sigma X)^2}{n}} \right) \right]^{0,5}$$

$$s_B = \frac{s_{Y.X}}{\left[\Sigma X^2 - \frac{(\Sigma X)^2}{n} \right]^{0,5}}$$

$$s_A = s_{Y.X} \cdot \left[\frac{1}{n} + \frac{\left(\frac{\Sigma X}{n} \right)^2}{\Sigma X^2 - \frac{(\Sigma X)^2}{n}} \right]^{0,5}$$

waarbij n = het aantal monsters

X = de natuurlijke logaritme van het geometrisch gemiddelde celgetal volgens de Fossomatic (of Coulter Counter).

Y = de natuurlijke logaritme van het toegekende celgetal na onderzoek met de microscoop.

Er is nagegaan of de berekende waarden voor A en B significant afwijken van de waarde 0 voor A en 1.000 voor B (betrouwbaarheidsinterval van 95%). Dit is niet het geval indien:

$$A - t_{n-2}^{0.975} * sA < 0 < A + t_{n-2}^{0.975} * sA$$

respectievelijk

$$B - t_{n-2}^{0.975} * sB < 1,0 < B + t_{n-2}^{0.975} * sB$$

Gebruik van een tabel met Student-t-verdeling is nodig in verband met het beperkte aantal dataparen.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

De verkregen resultaten zijn in grafieken uitgezet en er zijn regressieberekeningen uitgevoerd.

De met * gemerkte grafieken zijn verkregen met Fossomatics die niet op 0 en 1,000 ingesteld waren, maar een zodanige instelling van slope en bias hadden dat het celgetal overeenkomt met de waarde van de Coulter Counter.

Uit bijlage 2 blijkt dat de regressielijn (Coulter Counter vs microscoop) significant verschil vertoont met de lijn $y = x$ (95% betrouwbaarheidsinterval: voor A (-1,2305 , -0,6311), voor B (1,1062 , 1,2023)). Het snijpunt met $y = x$ ligt bij $\ln = 6,0234$ wat overeenkomt met 420.000 cellen/ml. Over het algemeen wordt met de Coulter Counter in het hoge gebied (> 420.000 cellen/ml) minder geteld en in het lage gebied (< 420.000 cellen/ml) meer geteld ten opzichte van de microscoop.

In bijlage 3 worden de resultaten van de Fossomatic van melkcontrolestation Noord met 0 en 1,000 instelling weergegeven. De regressielijn van de microscoop vs Fossomatic vertoont een geringe afwijking t.o.v. $y = x$. Uit de regressieanalyse blijkt dat de afwijking niet significant is t.o.v. $y = x$ (95% betrouwbaarheidsinterval: voor A (-0,3885 , 0,0881), voor B (0,9843 , 1,0603)).

Bijlage 4 toont de resultaten van melkcontrolestation West met 0 en 1,000 instelling. De regressielijn vertoont een significante afwijking t.o.v. $y = x$ (95% betrouwbaarheidsinterval: voor A (-0,6224 , -0,1284), voor B (1,0258 , 1,1054)).

Melkcontrolestation Zuid gebruikt voor de celgetalanalyse verschillende instelling. Zo zijn er Fossomatics met 0 en 1,000 instelling en variabele instelling van de slope en bias. In bijlage 5 staan de resultaten verkregen met de 0 en 1,000 instelling. De regressielijn wijkt nauwelijks af van de lijn $y = x$. De regressieanalyse toont aan dat er geen significante afwijking van de lijn is t.o.v. de lijn $y = x$ (95% betrouwbaarheidsinterval: voor A (-0,3777 , 0,1259), voor B (0,9809 , 1,0613)). In bijlage 6 staan de resultaten verkregen met de Fossomatic met variabele instelling van slope en bias. De regressielijn vertoont een duidelijke afwijking t.o.v de lijn $y = x$ (95% betrouwbaarheidsinterval: voor A (-0,8970 , -0,3146), voor B (1,0744 , 1,1696)). Het snijpunt van de lijnen is $\ln = 5$, dit komt overeen met 150.000 cellen/ml. Boven de 150.000 cellen/ml worden er te weinig cellen geteld. Ook melkcontrolestation Oost gebruikt verschillende instellingen voor de Fossomatic. In bijlage 7 staat de regressielijn van de 0 en 1,000 instelling. De lijn vertoont een geringe afwijking van $y = x$. De regressieanalyse geeft geen significante afwijking t.o.v. $y = x$ (95% betrouwbaarheidsinterval: voor A (-0,4097 , 0,0969), voor B (0,9904 , 1,0721)). Bijlage 8 (Fossomatic met variabele instelling) vertoont eenzelfde beeld als bijlage 6. Het snijpunt is $\ln = 5,5$; dit komt overeen met 245.000 cellen/ml . Boven de 245.000 cellen/ml worden er te weinig cellen geteld (95% betrouwbaarheid-sinterval: voor A (-1,0737 , -0,6601), voor B (1,1239 , 1,1911)).

4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Het principe waarmee met de Coulter Counter deeltjes worden geteld is afwijkend van dat van de Fossomatic. De verwachting is dan ook dat de Coulter Counter geen geschikte referentiemethode is voor de celgetalbepaling met de Fossomatic. Uit de regressieanalyse blijkt dat dit inderdaad het geval is: de Coulter Counter telt lager in het hoge gebied en hoger in het lage gebied (snijpunt 420.000 cellen/ml). Een betere referentiemethode voor de Fossomatic lijkt de microscopische celtelling. De microscopische celtelling berust namelijk op hetzelfde principe als de celgetalbepaling met de Fossomatic. Uit de regressieanalyses met de Fossomatics blijkt inderdaad dat de microscopische celtelling meestal goed overeenkomt met de Fossomatic bepalingen mits de instelling slope = 1,000 en bias = 0 worden gebruikt.

Indien de slope en bias van de Fossomatic zodanig worden ingesteld dat het celgetal overeenkomt met de waarde voor de Coulter Counter (bijlage 6 en 8) blijkt dat al boven een celgetal van 150.000 resp. 245.000 cellen/ml te lage waarden worden verkregen ten opzichte van de microscopische celtelling. Aanbevolen wordt om bij de procedure van instelling van de Fossomatic te beginnen met slope = 1,000 en bias = 0. uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat, uitgaande van de waarden van de microscopische celtelling, in het merendeel van de gevallen de slope en bias bij 95% betrouwbaarheid niet significant afwijken van 1,000 en 0. Indien dit toch het geval is wordt er een correctie toegepast op de waarde die is gevonden bij slope = 1,000 en bias = 0 (5.6).

RIKILT-DLO heeft recent referentiemonsters ontwikkeld, die een minimale houdbaarheid van 2 maanden hebben, mits bewaard bij 0-2°C. De referentiewaarde van deze monsters wordt bepaald m.b.v. de microscoop (5.7). De bedoeling is deze monsters aan de melkcontrolestations te verstrekken zodat hiermee de instelling van de Fossomatic kan worden uitgevoerd.

5 LITERATUUR

5.1 Crombrugge van J.

Bruikbaarheid van de Fossomatic 360 om het celgetal in de melk te bepalen
Revue de l'agriculture/Landbouwtijdschrift 1989, vol 42, nr 2, pag 317-327

5.2 Recommended methods for somatic cell counting in milk

IDF document 168, 1984

5.3 Grappin R.

Defenition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory
IDF bulletin 208, 1985

5.4 A/S N. Foss Electric. Fossomatic 360, Operators instruction (type 15700)

Augustus 1986

5.5 Martens H. en T. Naes

Univariate calibration in multivariate calibration
Wiley. 1989

5.6 Bepaling van het celgetal in boerderijmelk met een fluoro-optoelectronische methode met behulp van een Fossomatic

COM 91/1003

5.7 Naber M.A.A.M., G.J.M. Loeffen en A.E.M. Vermunt

Onderzoek naar de bereiding en houdbaarheid van referentiemonsters voor de Fossomatic
RIKILT-DLO Rapport 91.40

BEPALING VAN HET AANTAL SOMATISCHE CELLEN IN MELK MET BEHULP VAN EEN MICROSCOPISCHE TELLING.

1 Onderwerp en toepassingsgebied

Deze procedure beschrijft de bepaling van het celgetal in referentiemonsters mengmelk met een microscopische methode.

2 Definities

Somatische cellen: deeltjes (leukocyten en epitheelcellen) met een minimale fluorescentie-intensiteit als gevolg van kleuring van het DNA in de celkernen.

Celgetal: het resultaat van een meting volgens de beschreven werkwijze uitgedrukt als het aantal somatische cellen per ml melk.

Referentiemonsters: geconserveerde monsters melk waaraan met behulp van de hierbij beschreven methode een celgetal wordt toegekend.

3 Principe en werking

Een hoeveelheid melk wordt gemengd met een bufferoplossing van ethidiumbromide. Het ethidiumbromide kan een complex vormen met het in de celkernen aanwezige DNA. Belichting van het dan ontstane fluoro-chroom brengt het in een aangeslagen toestand, welke bij terugval naar het oorspronkelijke energieniveau lichtenergie gaat uitzenden bij een karakteristieke golflengte. Het aantal oplichtende cellen wordt geteld met behulp van een fluorescentie-microscop.

4 Reagentia

4.1 Kleurstofoplossing

- Samenstelling

Ethidiumbromide*	2,5 g
Gedemineraliseerd water	1000 ml

* Ethidiumbromide is een mutagene stof; vermijd contactbesmetting en besmetting via de lucht.

- Bereiding

Los het ethidiumbromide onder verwarmen (40-60 °C) op. Deze oplossing is, mits in de koelkast (0-5 °C) bewaard, in een lichtdichte fles 2 maanden houdbaar.

4.2 Bufferoplossing

- Samenstelling

Kaliumhydroxyphtalaat	5,1	g
Kaliumhydroxide	1,375	g
Gedemineraliseerd water	1000	ml

- Bereiding

Los de ingrediënten op in het water.

Deze oplossing is, mits in de koelkast (0-5 °C) bewaard, 2 maanden houdbaar.

4.3 Standaardoplossing

- Samenstelling

Kleurstofoplossing (4.1)	200	ml
Bufferoplossing (4.2)	800	ml
Triton-X-100 concentraat	10	ml

- Bereiding

Voeg de componenten samen.

Deze oplossing is, mits in de koelkast (0-5 °C) bewaard, in een lichtdichte fles 2 maanden houdbaar.

4.4 Werkoplossing

- Samenstelling

Standaardoplossing	1	deel
Gedemineraliseerd water	9	delen

- Bereiding

Voeg de componenten samen.

Deze oplossing is, mits in de koelkast (0-5 °C) bewaard, 2 weken houdbaar.

5 Apparatuur en glaswerk

5.1 Cultuurbuizen van glas, lengte 80 mm, inhoud 12 ml.

5.2 Waterbad van 50 °C.

5.3 Micropipet van 1000 μ l
Micropipet van 100 μ l (verstelbaar)

5.4 Glaspreparaten

5.5 Föhn (facultatief)

5.6 Fluorescentie-microscop

6 Werkwijze

Verhit de buizen met melk in een waterbad van 50 °C gedurende 5 minuten. Koel af tot (kamer)temperatuur en meng goed (10 * 180° keren). Voeg met een micro-pipet 1 ml melk en 1 ml werkoplossing samen (zowel de melk als de werkoplossing dienen op het moment van pipetteren op kamertemperatuur te zijn); meng goed en plaats terug in het waterbad gedurende 1 minuut. Markeer een gebied van 5 bij 20 mm op een objectglas of leg er millimeterpapier onder waarop hetzelfde gebied gemarkeerd is.

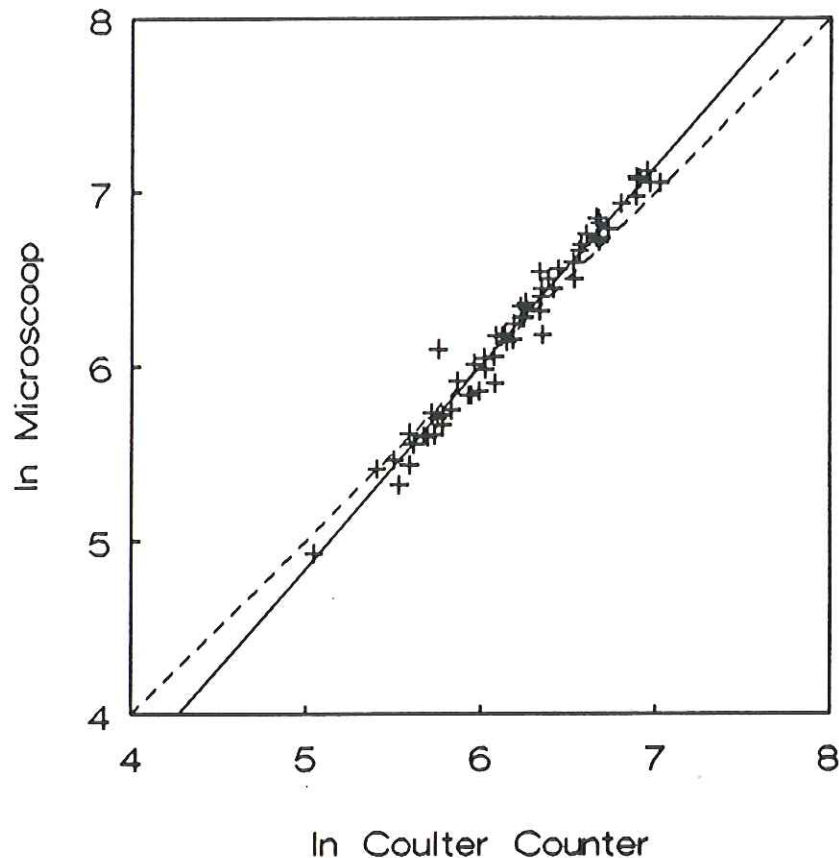
Pipeteer met een micro-pipet 0,01 ml van het afgekoelde mengsel en verdeel dit over het oppervlak van 5 bij 20 mm met de pipetpunt. Laat drogen aan de lucht of gebruik een föhn om dit te bespoedigen. Maak een duplo-preparaat. Tel vervolgens de cellen met behulp van een fluorescentie-microscoop.

Gebruik een vergroting van 500 ($12\frac{1}{2} \times 40$). De DNA-kernen van de cellen fluoresceren helder oranje/rood op een donkerrode achtergrond.

Er wordt geteld in zogenaamde banen. Eén baan is 5 mm lang (de breedte van het preparaat) en 0,3 mm breed (de doorsnede van het gezichtsveld van de microscoop). Alle cellen in zo'n baan worden geteld, door de axiaalknop langzaam te verdraaien. Er worden meerdere banen over de gehele lengte van het preparaat geteld, waarbij die banen zo goed mogelijk over het preparaat verdeeld zijn.

Om representatief te zijn moeten er minstens 400 cellen per preparaat worden geteld.

Correlatie celgetal Coulter Counter



Vergelijking van de lijn:

$$Y = -0.9308 + 1.1542X$$

Berekening of A en B significant van 0 en 1 afwijken:

$$n=65, t_{n-2}^{0.975}=2.000$$

95% betrouwbaarheidsinterval voor A:

$$-0.9308 - (2.000 * 0.1499) \leq A \leq -0.9308 + (2.000 * 0.1499)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } -1.2305 \leq A \leq -0.6311$$

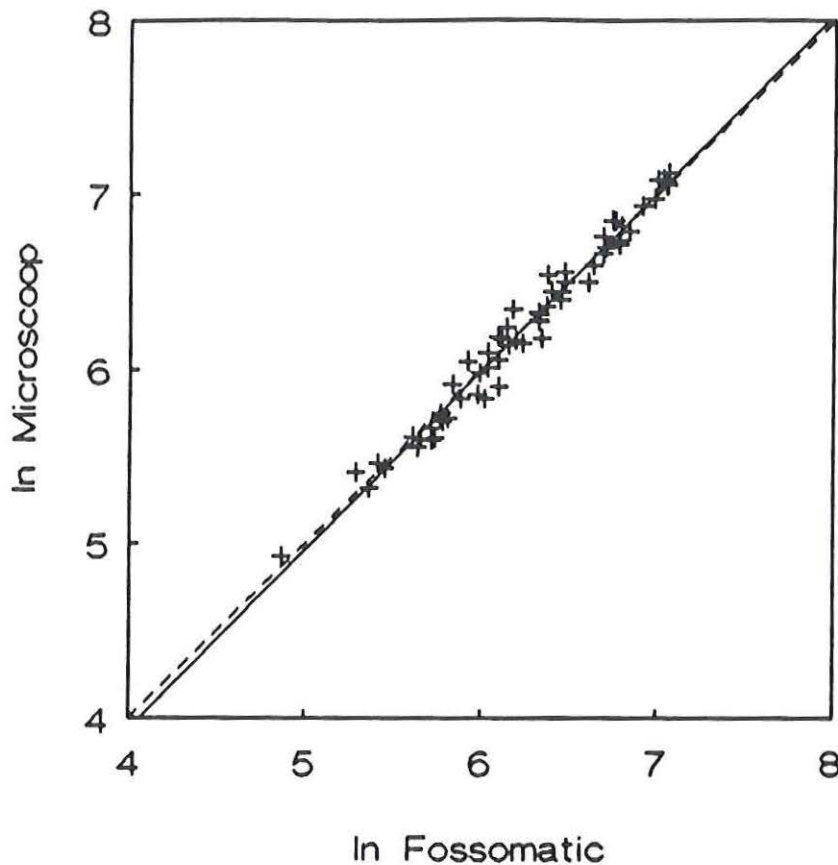
95% betrouwbaarheidsinterval voor B:

$$1.1542 - (2.000 * 0.0241) \leq B \leq 1.1542 + (2.000 * 0.0241)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } 1.1062 \leq B \leq 1.2023$$

A en B wijken significant af van 0 en 1

Correlatie celgetal MCS Noord



Vergelijking van de lijn:

$$Y = -0.1501 + 1.0223X$$

Berekening of A en B significant van 0 en 1 afwijken:

$$n=65, t_{n-2}^{0.975}=2.000$$

95% betrouwbaarheidsinterval voor A:

$$-0.1501 - (2.000 * 0.1191) \leq A \leq -0.1501 + (2.000 * 0.1191)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } -0.3883 \leq A \leq 0.0881$$

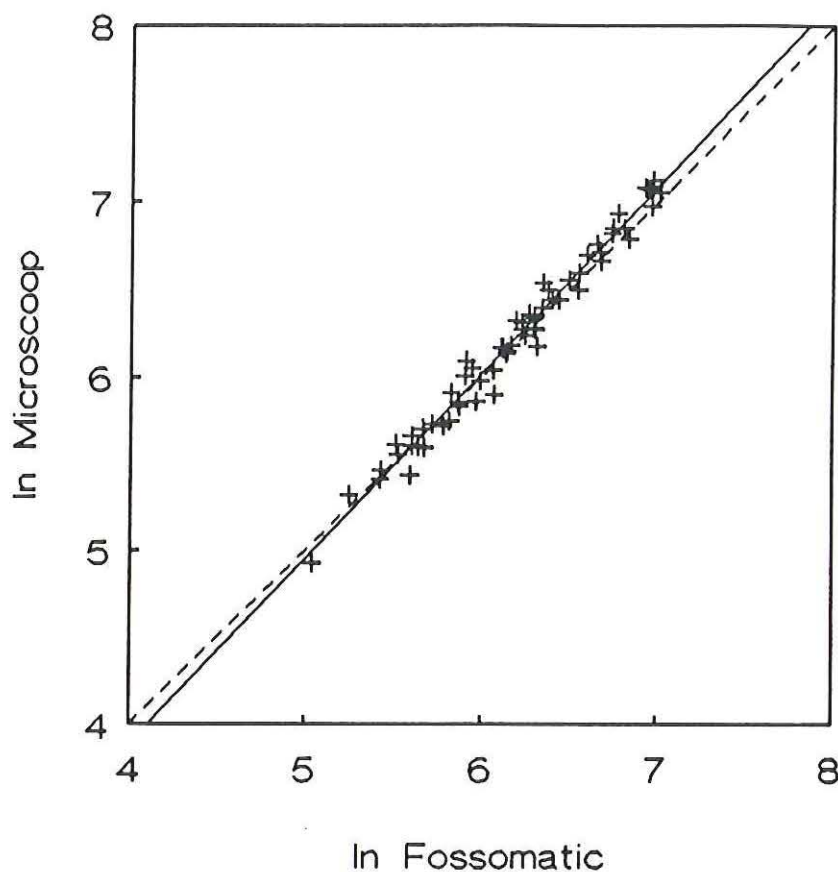
95% betrouwbaarheidsinterval voor B:

$$1.0223 - (2.000 * 0.0190) \leq B \leq 1.0223 + (2.000 * 0.0190)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } 0.9843 \leq B \leq 1.0603$$

A en B wijken niet significant af van 0 en 1

Correlatie celgetal MCS West



Vergelijking van de lijn:

$$Y = -0.3754 + 1.0656X$$

Berekening of A en B significant van 0 en 1 afwijken:

$$n=63, t_{n-2}^{0.975}=2.000$$

95% betrouwbaarheidsinterval voor A:

$$-0.3754 - (2.000 * 0.1235) \leq A \leq -0.3754 + (2.000 * 0.1235)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } -0.6224 \leq A \leq -0.1284$$

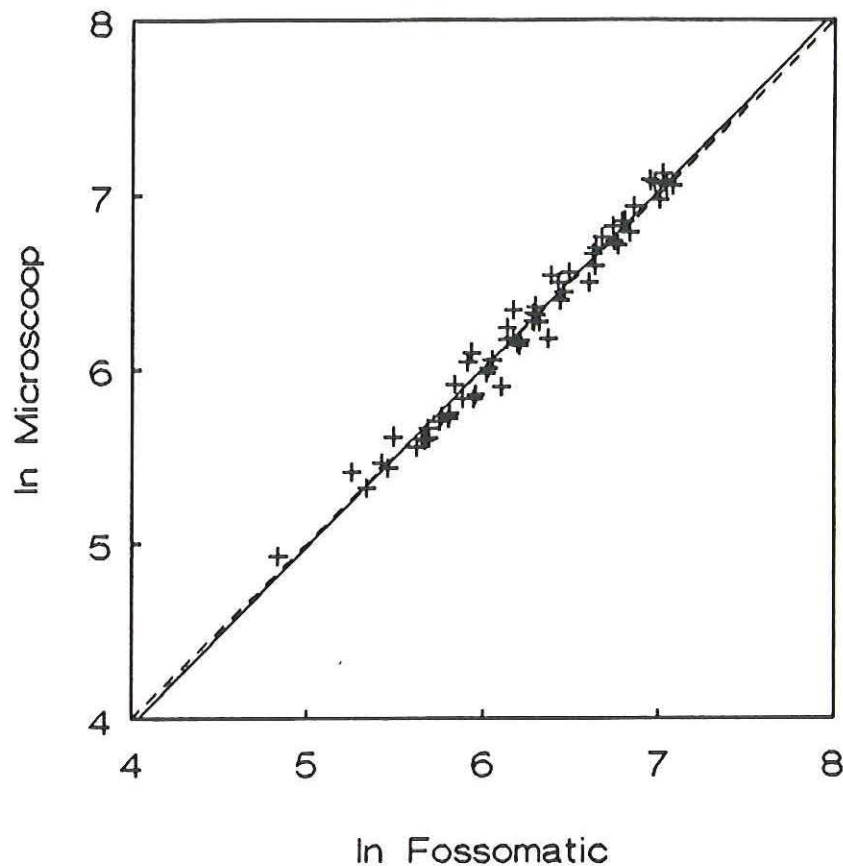
95% betrouwbaarheidsinterval voor B:

$$1.0656 - (2.000 * 0.0199) \leq B \leq 1.0656 + (2.000 * 0.0199)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } 1.0258 \leq B \leq 1.1054$$

A en B wijken significant af van 0 en 1

Correlatie celgetal MCS Zuid



Vergelijking van de lijn:

$$Y = -0.1259 + 1.0211X$$

Berekening of A en B significant van 0 en 1 afwijken:

$$n=65, t_{n-2}^{0.975}=2.000$$

95% betrouwbaarheidsinterval voor A:

$$-0.1259 - (2.000 * 0.1259) \leq A \leq -0.1259 + (2.000 * 0.1259)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } -0.3777 \leq A \leq 0.1259$$

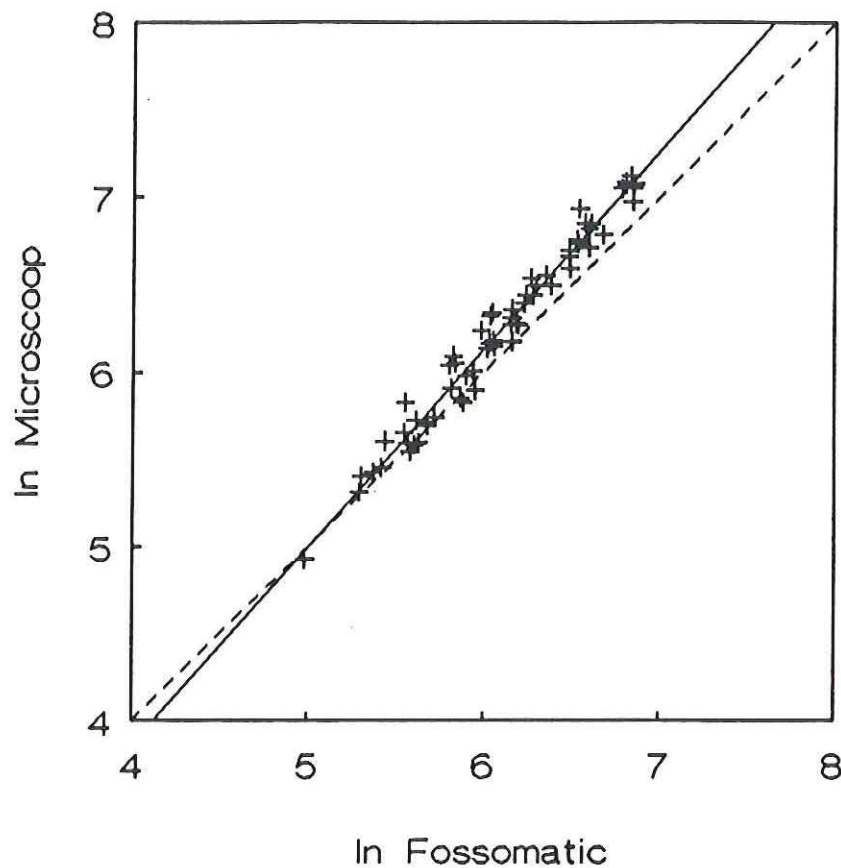
95% betrouwbaarheidsinterval voor B:

$$1.0211 - (2.000 * 0.0201) \leq B \leq 1.0211 + (2.000 * 0.0201)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } 0.9809 \leq B \leq 1.0613$$

A en B wijken niet significant af van 0 en 1

Correlatie celgetal MCS Zuid*



Vergelijking van de lijn:

$$Y = -0.6058 + 1.1220X$$

Berekening of A en B significant van 0 en 1 afwijken:

$$n=65, t_{n-2}^{0.975}=2.000$$

95% betrouwbaarheidsinterval voor A:

$$-0.6058 - (2.000 * 0.1456) \leq A \leq -0.6058 + (2.000 * 0.1456)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } -0.8970 \leq A \leq -0.3146$$

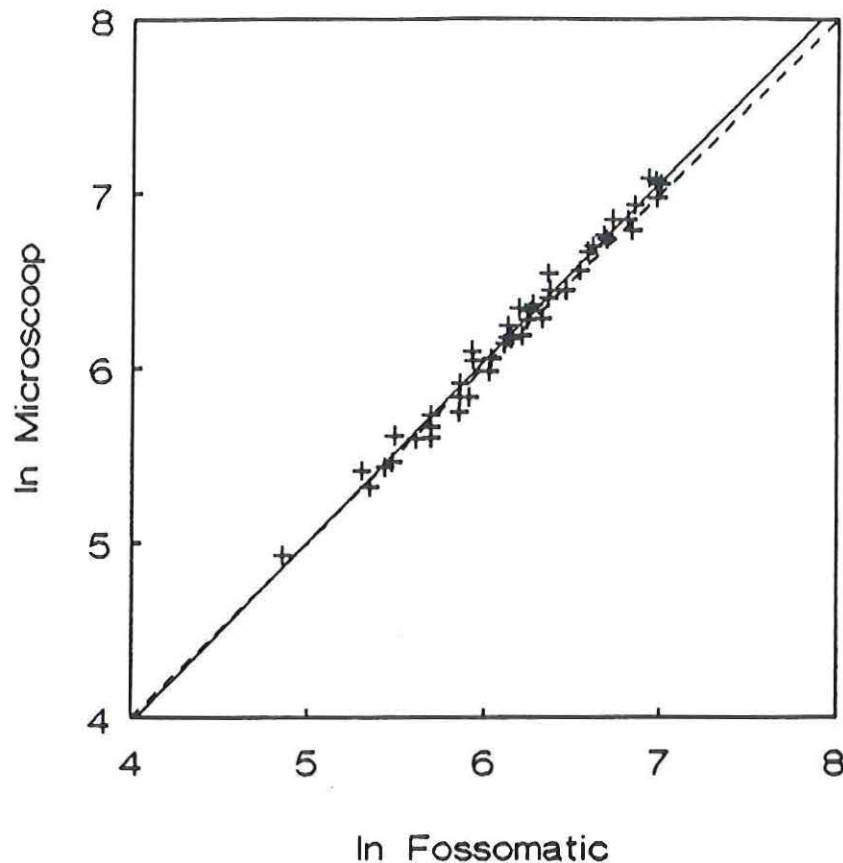
95% betrouwbaarheidsinterval voor B:

$$1.1220 - (2.000 * 0.0238) \leq B \leq 1.1220 + (2.000 * 0.0238)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } 1.0744 \leq B \leq 1.1696$$

A en B wijken significant af van 0 en 1

Correlatie celgetal MCS Oost



Vergelijking van de lijn:

$$Y = -0.1564 + 1.0313X$$

Berekening of A en B significant van 0 en 1 afwijken:

$$n=45, t_{n-2}^{0.975}=2.020$$

95% betrouwbaarheidsinterval voor A:

$$-0.1564 - (2.020 * 0.1254) \leq A \leq -0.1564 + (2.020 * 0.1254)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } -0.4097 \leq A \leq 0.0969$$

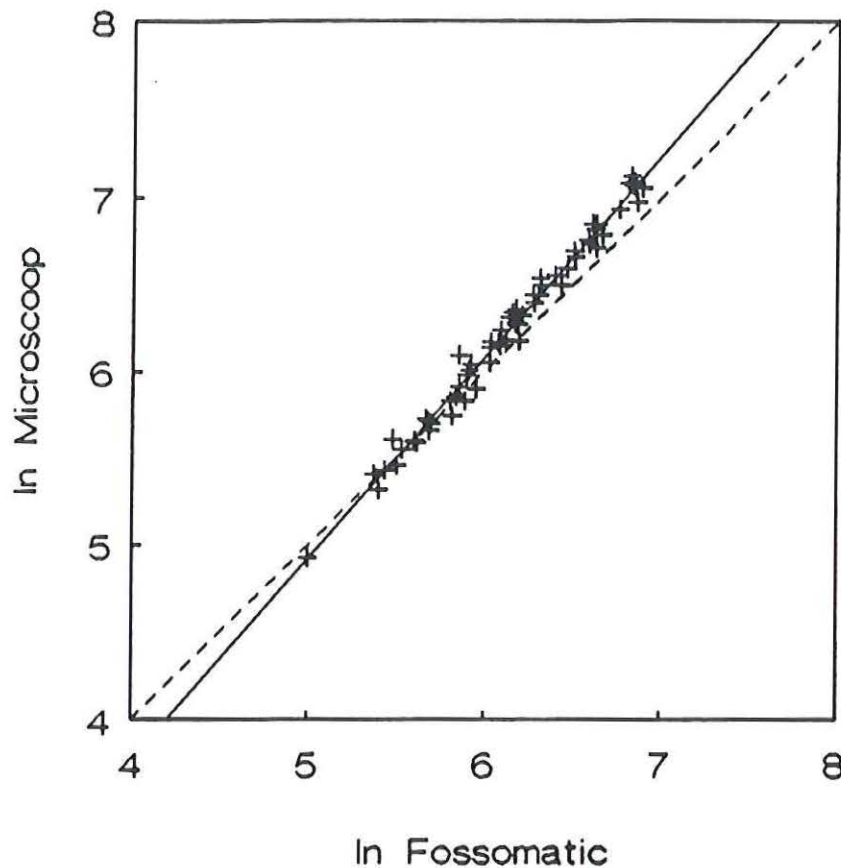
95% betrouwbaarheidsinterval voor B:

$$1.0313 - (2.020 * 0.0202) \leq B \leq 1.0313 + (2.020 * 0.0202)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } 0.9904 \leq B \leq 1.0721$$

A en B wijken niet significant af van 0 en 1

Correlatie celgetal MCS Oost*



Vergelijking van de lijn:

$$Y = -0.8669 + 1.1575X$$

Berekening of A en B significant van 0 en 1 afwijken:

$$n=65, t_{n-2}^{0.975}=2.000$$

95% betrouwbaarheidsinterval voor A:

$$-0.8669 - (2.000 * 0.1034) \leq A \leq -0.8669 + (2.000 * 0.1034)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } -1.0737 \leq A \leq -0.6601$$

95% betrouwbaarheidsinterval voor B:

$$1.1575 - (2.000 * 0.0168) \leq B \leq 1.1575 + (2.000 * 0.0168)$$

$$95\% \text{ betrouwbaarheidsinterval: } 1.1239 \leq B \leq 1.1911$$

A en B wijken significant af van 0 en 1